

益气康萎汤通过调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路抑制慢性萎缩性胃炎大鼠胃上皮细胞焦亡的机制研究

梅芳玉¹, 杨钰珂¹, 张雯¹, 邹雅¹, 杨阳², 刘浩¹
(1. 川北医学院中西医结合临床医学院, 四川 南充 637000; 2. 达州市第一人民医院, 四川 达州 635000)

【摘要】目的：观察益气康萎汤对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠胃黏膜损伤的改善作用,并探究其抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路介导的胃上皮细胞焦亡的可能机制。**方法：**39 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组($n=6$)与模型组($n=33$),模型组建立慢性萎缩性胃炎模型,造模成功的 30 只大鼠随机分为 CAG 模型组、益气康萎汤低剂量组、益气康萎汤中剂量组、益气康萎汤高剂量组和维酶素组,每组各 6 只。阳性药组灌胃维酶素($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$);对照组和 CAG 模型组大鼠灌胃等量生理盐水,持续 4 周。干预期间观察大鼠一般症状,每周检测大鼠体质量,干预结束后通过 HE 染色观察胃组织病理情况,ELISA 测血清胃蛋白酶原 I (PG I)、胃蛋白酶原 II (PG II),并计算 PG I /PG II 比值(PGR)及胃液中白细胞介素 18 (IL-18)、白细胞介素 1β (IL- 1β)水平,免疫组化检测胃组织中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、消皮素 D N 端片段(GSDMD-N)和高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)表达,Western blot 检测胃组织中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、裂解 Caspase-1(cleaved Caspase-1)、IL-18、IL- 1β 、裂解 IL- 1β (cleaved IL- 1β)、消皮素 D (GSDMD)、GSDMD-N、NLRP3、核因子 κB (p65)和磷酸化核因子 κB (p-p65)蛋白表达。**结果：**与 CAG 模型组比,益气康萎汤能够改善大鼠精神状态并增加体质量;改善胃组织病理形态,降低病理学评分($P<0.05$);降低血清中 PG I ($P<0.05$),增加 PG II 及 PGR($P<0.05$),降低胃液中 IL-18 和 IL- 1β 水平($P<0.05$);降低胃组织中 NLRP3、GSDMD-N 和 HMGB1 的表达($P<0.05$);降低 cleaved Caspase-1、IL-18、cleaved IL- 1β 、GSDMD-N、NLRP3 和 p-p65 蛋白表达($P<0.05$)。**结论：**益气康萎汤可能通过调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路抑制 CAG 大鼠细胞焦亡及炎症的发生来缓解胃萎缩和胃组织损伤,为 CAG 的治疗提供新的理论依据和治疗思路。

【关键词】慢性萎缩性胃炎;益气康萎汤;细胞焦亡;炎症;NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路
【中图分类号】R573.32 **【文献标志码】**A

Inhibition of gastric epithelial cell pyroptosis in a rat model of chronic atrophic gastritis by Yi Qi Kang Wei Decoction through regulation of the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway

MEI Fang-yu¹, YANG Yu-ke¹, ZHANG Wen¹, ZOU Ya¹, YANG Yang², LIU Hao¹
(1. Clinical Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000 ; 2. Dazhou First People's Hospital, Dazhou 635000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the ameliorative effect of Yi Qi Kang Wei Decoction on gastric mucosal injury in rats with chronic atrophic gastritis (CAG) and to explore its underlying mechanism by which it inhibits pyroptosis of gastric epithelial cells mediated by the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway. **Methods:** 39 male SD rats were randomly divided into a control group ($n=6$) and a model group ($n=33$), the model group established a CAG model. Among the 30 rats with successful modeling, they were randomly assigned to the CAG model group, the low-dose group of Yi Qi Kang Wei decoction, the medium-dose group of Yi Qi Kang Wei Decoction, the high-dose group of Yi Qi Kang Wei Decoction, and the vitacoenzyme group. Each group consisted of 6 rats. Yi Qi Kang Wei Decoction low, medium and high dose groups were intragastric administrated with compound water decoction 5 g/kg/d, 10, 15 g/kg/d and 20, 3 g/kg/d, respectively, the positive drug group was administered with vitacoenzyme (200 mg/kg/d), the control group and the CAG model group were administered with the

same volume of normal saline. The rats were observed for general symptoms during the intervention period, and their body weight was measured weekly. After the intervention, the gastric tissue pathological conditions were observed by HE staining. The levels of serum pepsinogen I (PGI), pepsinogen II (PGII), and the PGI/PGII ratio (PGR) were measured by ELISA, and the levels of interleukin-18 (IL-18) and interleukin-1 β (IL-1 β) in gastric juice were measured. The expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), GSDMD-N-terminal fragment (GSDMD-N), and high mobility group box 1 (HMGB1) in gastric tissue was detected by immunohistochemistry. The expression of Caspase-1, cleaved Caspase-1, IL-18, IL-1 β , cleaved IL-1 β , GSDMD, GSDMD-N, NLRP3, nuclear factor κ B (p65), and phosphorylated nuclear factor κ B (p-p65) proteins in gastric tissue was measured by Western Blot. **Results:** Compared with the CAG model group, Yi Qi Kang Wei Decoction could improve the mental state and weight gain of rats, improve the histopathological morphology and reduce the pathological scores of gastric tissue, lower the levels of PGI in serum, increase the levels of PGII and PGR, and lower the levels of IL-18 and IL-1 β in gastric juice, reduce the expression of NLRP3, GSDMD-N, and HMGB1 in gastric tissue, and lower the expression of cleaved Caspase-1, IL-18, cleaved IL-1 β , GSDMD-N, NLRP3, p-p65, and phosphorylated p65 protein. **Conclusion:** Yi Qi Kang Wei Decoction may inhibit the occurrence of cell pyroptosis and inflammation in CAG rats by regulating the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway, thereby alleviating gastric atrophy and gastric tissue damage, providing new theoretical basis and therapeutic ideas for the treatment of CAG.

【Key words】 Chronic atrophic gastritis; Yi Qi Kang Wei Decoction; Pyroptosis; Inflammation; NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 作为消化系统的常见疾病, 在全球范围内有着较高的发病率^[1]。它以胃黏膜固有腺体萎缩为主要病理特征, 常伴有肠化生、不典型增生等病变^[2]。临床症状多表现为上腹部疼痛、胀满、消化不良等, 严重影响患者的生活质量^[3]。更为严峻的是, CAG 被公认为是胃癌的癌前病变, 其发展为胃癌的风险相对较高^[4]。因此, 积极探索有效的治疗方法对于阻断疾病进展、降低胃癌发生率至关重要。目前, 西方医学治疗以对症处理和病因干预为主, 缺乏逆转胃黏膜萎缩和肠化的特效药物, 且手术治疗仅适用于癌前病变或早期癌变。相比之下, 中医药在治疗 CAG 中展现出独特优势, 其通过多靶点、多途径的整体调节作用, 在改善临床症状、延缓病理进展方面效果显著, 且通常具有毒副作用小的特点, 因此已成为该领域的研究热点。细胞焦亡作为一种新型的程序性细胞死亡方式, 近年来成为医学研究的热点^[5]。它与炎症反应密切相关, 具有强烈的促炎特性^[6]。在 CAG 的发生发展过程中, 胃上皮细胞焦亡异常活跃, 导致胃黏膜屏障功能受损, 炎症因子大量释放, 进一步加重胃黏膜的损伤, 形成恶性循环^[7]。因此, 深入研究胃上皮细胞焦亡的机制, 并寻找能够有效抑制焦亡的治疗手段, 是当前 CAG 研究的关键方向。核苷酸结合寡聚化结构域样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)/天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)/消皮素 D (GSDMD) 信号通路在细胞焦亡的调控中起着核心作用^[8]。NLRP3 炎性小体能够识别多种危险信号并被激活, 招募 Caspase-1 前体并使其活化, 活化的 Caspase-1 可以切割 GSDMD, 产生具有打孔功能的 N 端片段, 使

细胞膜形成孔洞, 最终导致细胞发生焦亡^[9]。越来越多的研究^[10-12]表明, 该信号通路在 CAG 胃上皮细胞焦亡过程中处于异常激活状态。益气康萎汤是课题组自行拟定的方剂, 它由枳壳、厚朴、干姜、党参、茯苓、半夏、三七粉、白花蛇舌草、半枝莲这九味中药组成。从中医理论来看, CAG 的病机核心为脾胃气虚、正气不足, 在此基础上兼有气滞、血瘀、湿阻、热毒等病理产物。本方遵循“扶正祛邪”的治疗原则, 以党参、茯苓益气健脾以扶正固本; 辅以半夏、干姜温中化湿, 枳壳、厚朴行气除满, 共理气机; 佐以三七粉活血化瘀, 白花蛇舌草、半枝莲清热解毒以祛邪。全方共奏益气健脾、行气活血、清热解毒之功。在实际应用中发现, 该方剂对于缓解慢性萎缩性胃炎的相关症状效果良好。从现代药理学角度来看, 已有研究^[13-15]表明, 三七、白花蛇舌草、半枝莲、茯苓等中药材在萎缩性胃炎的治疗中, 能够对胃黏膜起到良好的修复作用。然而, 益气康萎汤改善 CAG 的具体分子机制尚不明确。本研究的创新之处在于, 首次将益气康萎汤的疗效与细胞焦亡这一前沿机制相联系。本研究基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路, 旨在深入探讨益气康萎汤对慢性萎缩性胃炎大鼠胃上皮细胞焦亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年 SPF 级 SD 大鼠 (6~8 周龄, 雄性, 体质量 200 $\pm$ 20 g), 39 只, 购自四川里来思诺生物科技有限公司, 许可证编号: SCXK (川 2020-0030)。本动物实验经川北医学院动物伦理委员会审查 (项目批准号: 2024057)。

1.1.2 实验药物及制备 益气康萎汤采用中药免煎颗粒混合组成,其中枳壳 12 g(批号:23025171)、厚朴 12 g(批号:23023691)、干姜 6 g(批号:2312001c)、党参 20 g(批号:22030341)、茯苓 15 g(批号:23031541)、半夏 12 g(批号:23029972)、三七粉 9 g(批号:21038761)、白花蛇舌草 15 g(批号:23002792)、半枝莲 12 g(批号:22035712)均购自北京康仁堂,干姜购自合肥华润三九医药有限公司。益气康萎汤高剂量药物配置:称取益气康萎汤颗粒 60.9 g 加蒸馏水至 30 mL,60℃水浴 5 min,混悬均匀即得。将高剂量药液稀释一倍即得益气康萎汤中剂量药液,将中剂量药液稀释一倍即得益气康萎汤低剂量药液,现用现配。维酶素片(CZ005,购自国药大药房),阳性药物配置:取维酶素片 600 mg 加蒸馏水至 30 mL,完全溶解,现配现用。脱氧胆酸钠溶液(S104198-100g,购自阿拉丁)。

1.1.3 主要试剂与仪器 Rat IL-1 β ELISA KIT(货号:ZC-36391)、Rat IL-18 ELISA KIT(货号:ZC-36389)、Rat PG I ELISA KIT(货号:ZC-37308)和 Rat PG II ELISA KIT(货号:ZC-37309)购自上海茁彩生物科技有限公司。一抗(GSDMD-N)(货号:20770-1-AP)、一抗(HMGB1)(货号:10829-1-AP)购自 Proteintech。一抗(NLRP3)(货号:PA5-79740)购自 ThermoFisher。HRP 标记山羊抗兔(货号:GB22303)购自 Servicebio。GSDMD(货号:ab219800)单克隆抗体购自 Abcam。p-p65(货号:3033)单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology。IL-1 β (货号:bs-0812R)单克隆抗体购自 Bioss。p65(货号:10745-1-AP)单克隆抗体购自 HUABIO。TLR4(货号:19811-1-AP)、单克隆抗体购自 Proteintech。 β -actin(货号:AC026)、IL-18(货号:A16737)和 NLRP3(货号:A5652)单克隆抗体购自 Abclonal。Caspase1(货号:AF5418)单克隆抗体和 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP(货号:S0001)购自 Affinity。WB 试剂盒(货号:P0013)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号:P0009)购自上海碧云天生物技术有限公司。高速低温组织研磨仪(型号:KZ-III-F)购自武汉塞维尔科技有限公司。酶标仪(型号:SpectraMAX Plus384)购自美谷分子仪器有限公司。垂直电泳槽(型号:JY-SCZ4+)购自北京君意东方电泳设备有限公司。全自动化学发光图像分析系统(型号:5200 Multi)购自 Tanon。数码三目摄像显微摄像系统(型号:BA400Digital)购自麦克奥迪实业集团有限公司。

1.2 方法

1.2.1 慢性萎缩性胃炎大鼠模型构建 实验动物

适应性饲养 1 周,在室温(22 $\pm$ 2)℃,12 h/12 h 昼夜节律交替的环境中饲养,期间自由饮水进食。将 39 只大鼠随机分为对照组($n=6$)与模型组($n=33$)。对照组大鼠保持正常饮食,其余组大鼠给予 0.1% 氨水和 20 mmol/L 的脱氧胆酸钠溶液(代替水)交替自由饮用,同时采用饥饱失常法进行造模(2 d 足食,1 d 禁食),循环实施 8 周,在此基础上配合游泳致疲劳(以大鼠游泳动作失调作为疲劳判断终点,即大鼠身体下沉鼻孔没入水面超过 5 s 无法主动上浮;肢体划水动作明显不协调或停止,仅依赖被动漂浮;翻正反射延迟(将大鼠捞出后仰卧位放置,超过 10 s 无法自行翻转)。若大鼠在游泳过程中出现上述任一表现,即判定为达到疲劳状态)。在造模的后 4 周,饮食后进行 10 min 游泳,建立慢性萎缩性胃炎模型。随机取 3 只大鼠进行胃组织病理学检查,以胃黏膜及腺体萎缩视为造模成功。

确认造模成功后,将造模组剩余 30 只大鼠,随机分为 CAG 模型组、益气康萎汤低剂量组、益气康萎汤中剂量组、益气康萎汤高剂量组和维酶素组,每组各 6 只。随后进行药物干预:对照组和 CAG 模型组大鼠灌胃等量生理盐水;阳性药组灌胃维酶素(200 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$);益气康萎汤低剂量组灌胃复方水煎液(5 g $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$);益气康萎汤中剂量组灌胃复方水煎液(10.15 g $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$);益气康萎汤高剂量组灌胃复方水煎液(20.3 g $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$)。持续 4 周。末次给药结束后,使用戊巴比妥钠麻醉大鼠,在无菌条件下行腹主动脉取血,室温静置 1 h 以上,以 3 000 r/min 离心 10 min,收集上清即为大鼠血清样本。解剖并收集大鼠胃液、胃组织样本进行后续实验检测。

1.2.2 一般临床特征观察 观察各组大鼠外观状态变化、精神状态、活动情况以及统计治疗 4 周的大鼠体质量变化趋势。

1.2.3 HE 染色 大鼠胃组织经 10% 甲醛固定,无水乙醇脱水处理,二甲苯透明、包埋,切片机切片。切片脱蜡至水,苏木精染色 5~10 min,盐酸酒精溶液分化,弱碱性水溶液反蓝,入醇溶性伊红 3 min,酒精脱水透明剂透明,中性树胶封固后显微镜镜检,采集图像并分析。

1.2.4 胃黏膜组织病理学评分 由两名经验丰富的病理医师在双盲状态下对 HE 染色的胃黏膜切片进行观察和评分。参照相关文献^[16]并结合本实验观察,主要从腺体萎缩、炎性细胞浸润两个方面进行半定量评分。评分标准:0 分(无异常);1 分(轻度改变:病变范围 $<25\%$);2 分(中度改变:病变范围 $25\%\sim50\%$);3 分(重度改变:病变范围 $>50\%$)。

每张切片的总病理学评分为两项指标得分之和,用于评估胃黏膜损伤程度。

1.2.5 ELISA 检测 PG I、PG II、IL-18 和 IL-1 β 浓度 采集血液进行离心处理,以 3 000 r/min,离心 10 min,−70 ℃保存,根据 ELISA 检测试剂盒说明进行操作,检测血清 PG I、PG II 水平并计算两者的比值(PGR)及 IL-18 和 IL-1 β 浓度。

1.2.6 免疫组化染色 大鼠胃组织经 10%甲醛固定,无水乙醇脱水处理。随后进行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,进行血清封闭,滴加一抗 GSDMD-N(1:200)、HMGB1(1:200)和 NLRP3(1:100)4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤后滴加二抗 HRP 标记山羊抗兔(1:100),PBS 洗涤滴加 DAB 显色液,蒸馏水洗涤终止显色,后苏木素复染细胞核,清洗随后脱水封片。使用显微摄像系统对切片进行图像采集,计算阳性面积占比。

1.2.7 Western blot 检测 Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 、cleaved IL-1 β 、GSDMD、GSDMD-N、NLRP3、p65 和 p-p65 蛋白表达 取大鼠胃组织研磨,提取组织中总蛋白,对蛋白进行定量,然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,分离蛋白转到 PVDF 膜,封闭,加入一抗 Caspase1(1:2 000);p-p65(1:1 000);p65(1:1 000);GSDMD(1:2 000);IL-1 β (1:2 000);IL-18(1:2 000);NLRP3(1:2 000); β -actin(1:50 000),4 ℃孵育过夜;将 PVDF 膜放入二抗(稀释浓度:1:5 000)中,室温孵育 2 h,ECL 显色,测定蛋白表达情况。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差检验,进一步两两比较,采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床特征观察

与对照组大鼠相比,CAG 模型组大鼠出现精神不振、活动频次降低、反应速度变慢、进食欲望减退、小便颜色深黄且质地浓稠、大便黏腻的情况,体质量下降。采用益气康萎汤和维酶素进行干预治疗后,大鼠的上述症状都有不同程度的减轻,并且在益气康萎汤和维酶素治疗 4 周后大鼠体质量都不同程度增加。见图 1。

2.2 各组大鼠胃组织病理学评分结果

HE 染色切片的病理学评分显示,与对照组相比,CAG 模型组大鼠的病理学损伤总分升高($P <$

0.05),表明模型造成了严重的胃黏膜损伤。与 CAG 模型组相比,益气康萎汤低、中、高剂量组及维酶素组的病理学损伤评分均降低($P < 0.05$),益气康萎汤中、高剂量组及维酶素组腺体萎缩评分显著降低($P < 0.05$)。见表 1。

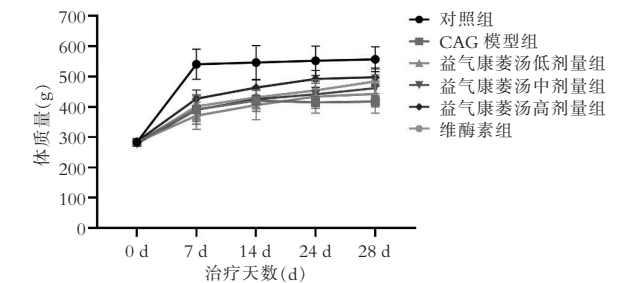


图 1 各组大鼠治疗后体质量变化

表 1 各组大鼠胃粘膜组织损伤评分统计结果($\bar{x} \pm s$,分)

组别	腺体萎缩评分	炎性细胞浸润评分	损伤评分
对照组($n=6$)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
CAG 模型组($n=6$)	1.00 $\pm$ 0.00 ^①	3.00 $\pm$ 0.00 ^①	4.00 $\pm$ 0.00 ^①
益气康萎汤低剂量组($n=6$)	0.67 $\pm$ 0.58	1.33 $\pm$ 0.58 ^②	2.00 $\pm$ 1.00 ^②
益气康萎汤中剂量组($n=6$)	0.33 $\pm$ 0.58 ^②	1.00 $\pm$ 0.00 ^②	1.33 $\pm$ 0.58 ^②
益气康萎汤高剂量组($n=6$)	0.00 $\pm$ 0.00 ^②	0.33 $\pm$ 0.58 ^②	0.33 $\pm$ 0.58 ^②
维酶素组	0.00 $\pm$ 0.00 ^②	0.33 $\pm$ 0.58 ^②	0.33 $\pm$ 0.58 ^②
<i>F</i> 值	4.80	21.60	20.40
<i>P</i> 值	0.012	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$,与对照组比较;② $P < 0.05$,与 CAG 模型组比较。

2.3 各组大鼠胃组织病理形态学变化

对照组大鼠胃组织黏膜层结构完整,黏膜下层疏松结缔组织内可见血管和神经,未见炎性细胞及增生,未见明显异常病理变化;CAG 模型组大鼠胃组织黏膜层萎缩变薄,固有层胃腺萎缩坏死、结构模糊,伴有炎性细胞浸润,黏膜层充血出血;益气康萎汤低、中、高剂量组及维酶素组的大鼠胃组织病变程度都有不同程度减轻,其中益气康萎汤高剂量组和维酶素组改善最明显,益气康萎汤中剂量组次之,益气康萎汤低剂量组改善效果较小。见图 2。

2.4 ELISA 检测大鼠血清中 PG I、PG II、IL-18 和 IL-1 β 浓度

与对照组相比,CAG 模型组大鼠中 IL-18、IL-1 β 和 PG II 均增加($P < 0.001$),PG I 和 PGR 均降低($P < 0.05$);与 CAG 模型组相比,益气康萎汤低、中、高剂量组和维酶素组 IL-18、IL-1 β 和 PG II 均降低($P < 0.05$),PG I 和 PGR 均增加($P < 0.05$)。见表 2。

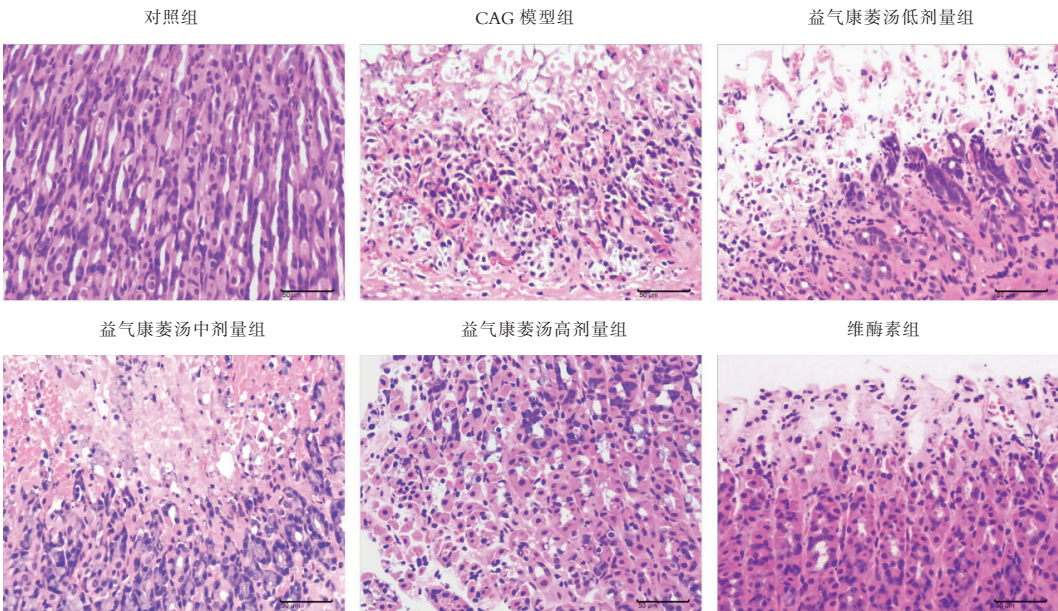


图 2 各组大鼠胃组织 HE 染色病理形态学变化(×400)

表 2 各组大鼠血清中 IL-18、IL-1β、PG I 和 PG II 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-18($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-1β($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	PG I ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	PG II ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	PGR
对照组($n=6$)	22.07±0.57	7.23±0.79	15.61±0.63	1.91±0.23	8.25±0.89
CAG 模型组($n=6$)	34.53±1.80 ^①	12.94±0.28 ^①	6.49±0.88 ^①	3.52±0.17 ^①	1.84±0.22 ^①
益气康萎汤低剂量组($n=6$)	30.83±1.05 ^②	11.91±0.46 ^②	13.10±1.17 ^②	3.09±0.21 ^②	4.26±0.48 ^②
益气康萎汤中剂量组($n=6$)	29.25±1.49 ^②	10.10±0.55 ^②	11.50±0.27 ^②	2.64±0.17 ^②	4.36±0.18 ^②
益气康萎汤高剂量组($n=6$)	27.90±1.41 ^②	9.01±0.24 ^②	8.81±0.51 ^②	2.17±0.16 ^②	4.07±0.22 ^②
维酶素组($n=6$)	26.97±1.22 ^②	9.17±0.47 ^②	8.79±1.15 ^②	2.12±0.13 ^②	4.16±0.64 ^②
F 值	30.00	52.19	47.59	35.93	49.37
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

① $P<0.05$,与对照组比较;② $P<0.05$,与 CAG 模型组比较。

2.5 免疫组化染色结果

苏木素染细胞核为蓝色,GSDMD-N、HMGB1、NLRP3 显出的阳性表达均为棕黄色。与对照组相比,CAG 模型组大鼠胃组织 GSDMD-N、HMGB1

和 NLRP3 阳性表达量均升高($P<0.05$);与 CAG 模型组相比,益气康萎汤低、中、高剂量组和维酶素组大鼠胃组织 GSDMD-N、HMGB1 和 NLRP3 阳性表达量均降低($P<0.05$)。见图 3 及表 3。

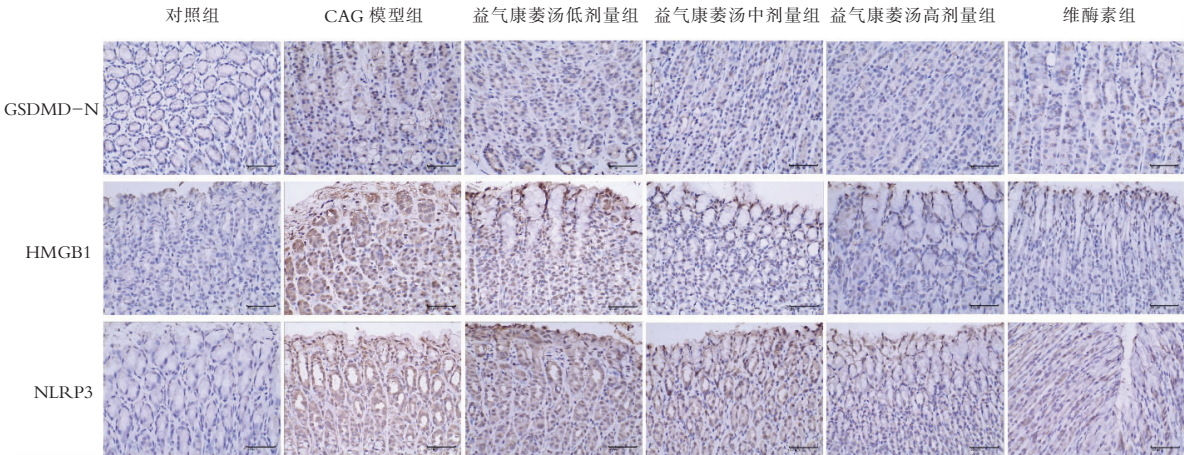


图 3 免疫组化染色 GSDMD-N、HMGB1、NLRP3(IHC×400)

表 3 各组大鼠胃组织中,GSDMD-N、HMGB1 和 NLRP3 的阳性面积占比($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	GSDMD-N	HMGB1	NLRP3
对照组($n=6$)	1.62±0.77	1.26±0.28	0.67±0.21
CAG 模型组($n=6$)	18.24±1.11 ^①	20.57±2.71 ^①	22.48±1.88 ^①
益气康萎汤低剂量组($n=6$)	13.35±1.86 ^②	17.39±1.30 ^②	17.62±1.98 ^②
益气康萎汤中剂量组($n=6$)	10.81±0.84 ^②	11.95±2.65 ^②	15.75±0.59 ^②
益气康萎汤高剂量组($n=6$)	3.78±0.44 ^②	5.84±0.30 ^②	3.44±0.99 ^②
维酶素组($n=6$)	6.81±0.94 ^②	6.30±0.69 ^②	6.22±0.79 ^②
F 值	98.67	59.35	146.299
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

① $P<0.05$,与对照组比较;② $P<0.05$,与 CAG 模型组比较。

2.6 大鼠胃组织中 Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 、cleaved IL-1 β 、GSDMD、GSDMD-N、NLRP3、p65 和 p-p65 蛋白表达检测结果

与对照组相比,CAG 模型组大鼠胃组织中 cleaved Caspase-1、IL-18、cleaved IL-1 β 、GSDMD-N、NLRP3 和 p-p65 蛋白表达水平均增加($P<0.05$);与 CAG 模型组相比,益气康萎汤低、中、高剂量组以及维酶素组大鼠胃组织中 cleaved Caspase-1、IL-18、cleaved IL-1 β 、GSDMD-N、NLRP3 和 p-p65 蛋白表达均降低($P<0.05$)。见图 4 及图 5。

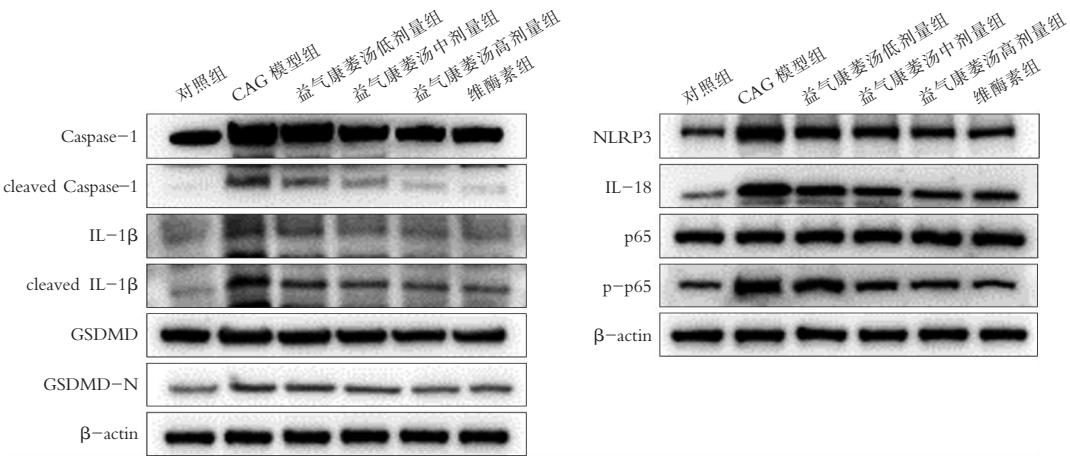


图 4 各组大鼠胃组织 Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 、cleaved IL-1 β 、GSDMD、GSDMD-N、NLRP3、p65 和 p-p65 蛋白免疫分析

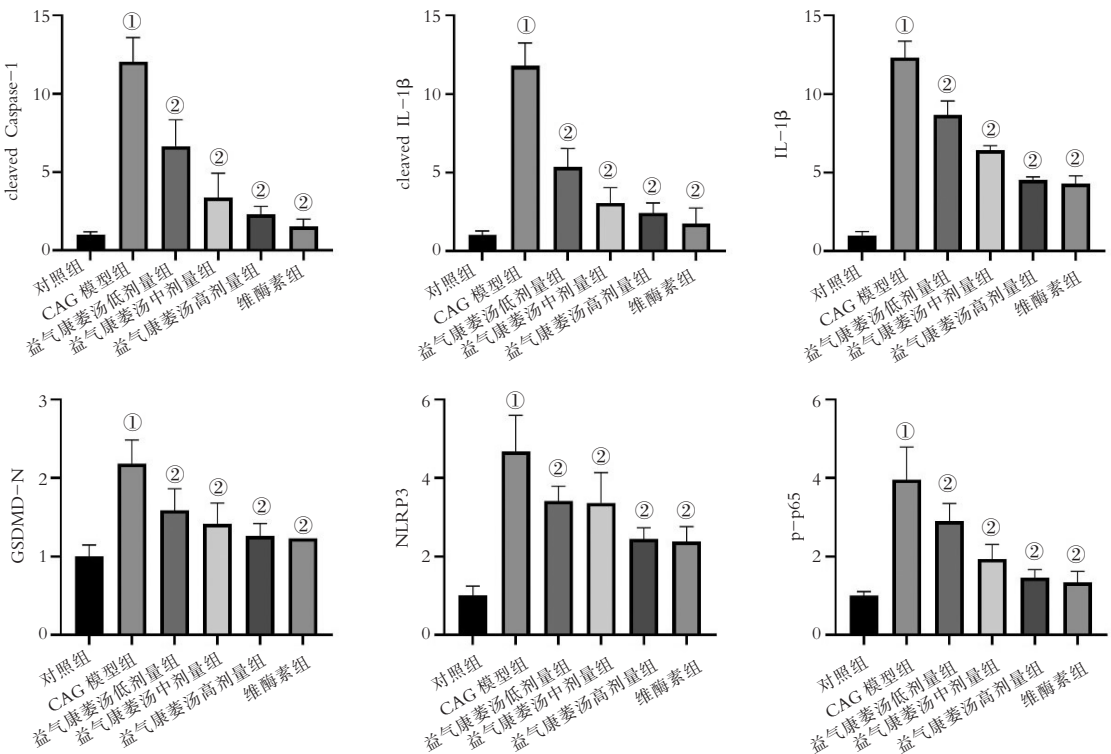


图 5 各组大鼠胃组织 cleaved Caspase-1、IL-18、cleaved IL-1 β 、GSDMD-N、NLRP3 和 p-p65 蛋白表达统计($n=6$)

① $P<0.05$,与对照组比较;② $P<0.05$,与 CAG 模型组比较。

3 讨论

CAG 以胃黏膜固有的腺体萎缩为特征,是一种消化系统疾病,主要由幽门螺杆菌感染、自身免疫反应和酒精中毒等因素引起^[17]。近年来,中药由于其多靶点调节能力和低毒性在治疗 CAG 的临床和实验环境中得到了广泛的研究^[2]。CAG 是胃癌癌前病变发展进程里的关键阶段,幽门螺杆菌感染是导致 CAG 发生与发展的主要因素,且和胃黏膜损伤紧密相关^[18]。西医治疗 CAG 时,主要采取根除幽门螺旋杆菌、保护胃黏膜、抑制胃酸以及胃镜下治疗等对症措施^[19]。不过,由于 CAG 的发生发展是一个慢性过程,容易反复出现,当前整体的治疗效果并不理想。因此,积极探寻治疗 CAG 并阻止或延缓其癌变的新方法、新思路十分必要。依据中医理论,CAG 的发病机制是脾胃虚弱,同时伴有湿热与瘀血的情况^[19]。益气康萎汤具备益气健脾、清热除湿以及活血化瘀的作用,契合中医的辨证准则。本研究中,在益气康萎汤干预后,CAG 大鼠体质量逐渐升高,并且大鼠精神与食欲得到缓解,更重要的是,HE 染色结果及病理学评分显示,益气康萎汤能改善胃黏膜的萎缩、炎性细胞浸润及上皮损伤,降低了病理总分,可见益气康萎汤在慢性萎缩性胃炎患者的症状和胃黏膜修复等方面现展示出了良好的成效。

胃萎缩是 CAG 的组织病理学阶段,血清蛋白酶原(PG)水平可以反映胃黏膜不同形态与功能。胃黏膜发生病理变化时,PG 分泌会发生改变,检测血清中 PG I 和 PG II 的含量及 PG I /PG II 比值(PGR),可作为一种非侵入性的筛查方法,用于诊断胃萎缩,这些生物标志物特异性高,与胃萎缩组织学标本具有一致性^[20-21]。血清 PG I 水平及 PGR 值降低,被认为是诊断萎缩性胃炎较好的血清学指标。本研究发现,益气康萎汤干预后,CAG 大鼠血清中 PG I 水平及 PGR 值升高,胃蛋白酶活性恢复正常,说明益气康萎汤具有促进胃黏膜损伤修复效果。益气康萎汤可提升 PG I 水平及 PGR 值,且高剂量组作用尤为明显,其效果与阳性对照药维酶素组相当,表明其在改善胃黏膜功能方面具有较好的治疗潜力。

当 CAG 发生时,湿热邪气侵犯胃黏膜,促使细胞内炎性体被激活,进而出现细胞焦亡的情况。而细胞焦亡会损害胃黏膜屏障,最终引发炎症反应^[22]。研究^[23-24]发现,抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路通过减少炎症因子的释放,如 IL-1 β 和 IL-18,可以有效减轻胃黏膜的炎症反应和组织损伤。Zhou 等^[25]研究表明,CAG 模型组大鼠胃

黏膜中炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 表达增加,NLRP3 失调。廖桂彬等^[26]通过临床实验观察到,脾胃湿热证患者的胃黏膜中 NLRP3 和 IL-1 β 炎性蛋白的表达水平升高,大部分表现为中重度表达。本研究检测结果,益气康萎汤干预 CAG 大鼠后血清中 IL-18 和 IL-1 β 含量均出现明显降低,说明益气康萎汤具有良好的抗炎效果。同时,维酶素组的 IL-18 和 IL-1 β 水平也低于模型组,进一步验证了通过抑制炎症反应是治疗 CAG 的有效途径。

NLRP3 是在外界刺激下启动炎症反应的关键介质^[27]。一旦 NLRP3 炎症小体被激活,便会诱导 pro-Caspase-1 发生剪切反应,生成具有活性的 cleaved-Caspase-1。随后,活性 Caspase-1 进一步对 GSDMD 蛋白进行剪切,释放出具有功能性的 N 端片段(GSDMD-N),这一片段可引发细胞膜形成孔洞,最终促使细胞发生焦亡现象^[28]。此外,Caspase-1 裂解并激活 IL-1 β 的前体(pro-IL-1 β)和 IL-18 的前体(pro-IL-18),将其转化为 cleaved-IL-1 β 和 cleaved-IL-18 分泌至细胞外,进一步放大炎症信号的传播^[8,29]。同时,NLRP3 炎症小体激活产生的炎症环境也会促使细胞主动将高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)从细胞核释放到细胞外^[30]。在慢性萎缩性胃炎患者体内,HMGB1 的表达水平往往会出现异常升高,HMGB1 作为一种炎症介质,可以通过激活 NF- κ B 信号通路,促进炎症因子的释放,从而加剧胃黏膜的炎症反应^[31]。智勇等^[32]发现 CAG 大鼠胃窦中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 以及 GSDMD-N 蛋白表达水平高于空白对照组,同时血清中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的含量也明显增加,细胞焦亡途径在 CAG 中被有效激活。Li 等^[33]在乙醇诱导 CAG 模型中发现,胃组织中 Caspase-1 被激活以及炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的生成与释放,表明细胞焦亡可能参与了 CAG 的发病机制。

本实验免疫组化显示,益气康萎汤干预后,CAG 大鼠胃组织中 GSDMD-N、HMGB1 和 NLRP3 表达水平均降低,维酶素组也观察到相似的下调作用。提示益气康萎汤可能通过减少细胞焦亡可保护胃黏膜细胞的完整性,避免因细胞内容物的释放而进一步加重炎症反应和组织损伤。检测胃组织中 Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 、cleaved IL-1 β 、GSDMD、GSDMD-N、NLRP3、p65 和 p-p65 等蛋白后发现,经益气康萎汤干预后,CAG 大鼠胃组织的 cleaved Caspase-1、IL-18、cleaved IL-1 β 、GSDMD-N、NLRP3 和 p-p65 蛋白表达均降低。提示益气康萎汤可能通过抑制炎症小体激活、减少炎症因子释放、抑制细胞焦亡及调控 NF- κ B 信号

通路等多种途径,发挥抗炎和保护胃黏膜的作用,对 CAG 具有一定的治疗效果。这一系列结果表明,益气康萎汤可能是通过抑制炎症小体激活、减少炎症因子释放、抑制细胞焦亡等多种途径,发挥其抗炎和保护胃黏膜的作用,从而对 CAG 具有显著的治疗效果。

综上,益气康萎汤具有缓解胃萎缩、减少胃组织损伤、抗炎、抑制细胞焦亡等多种作用,机制可能与抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路进而抑制炎症反应和细胞焦亡有关,为 CAG 治疗提供了新的思路与方法,值得进一步深入研究和临床推广应用。然而,本研究仍存在一定的局限性。首先,本研究仅为动物实验,其结果能否完全推及至临床尚需进一步的人体试验证实;其次,本研究主要探讨了 NLRP3 介导的细胞焦亡通路,但 CAG 的发病机制复杂,益气康萎汤是否通过其他信号通路发挥作用仍需深入探索。此外,益气康萎汤为中药复方,其发挥药效的具体活性成分及其相互作用机制尚未明确。因此,未来的研究方向可包括:开展设计严谨的临床试验,评估益气康萎汤治疗 CAG 的临床疗效和安全性;深入探究益气康萎汤对其他相关信号通路(如自噬、凋亡等)的影响;利用现代药理学技术分离和鉴定益气康萎汤中的关键有效成分或组分,并阐明其作用靶点。总之,本研究为 CAG 治疗提供了新的思路与方法,证实了益气康萎汤的有效性,值得进一步深入研究和临床推广应用。

参考文献

[1] Yin Y, Liang H, Wei N, *et al.* Prevalence of chronic atrophic gastritis worldwide from 2010 to 2020: an updated systematic review and meta-analysis[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2022, 11(12): 3697—3703.

[2] Kuang W, Xu J, Xu F, *et al.* Current study of pathogenetic mechanisms and therapeutics of chronic atrophic gastritis: a comprehensive review[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2024, 12: 1513426.

[3] Shah SC, Piazuelo MB, Kuipers EJ, *et al.* AGA clinical practice update on the diagnosis and management of atrophic gastritis: expert review [J]. *Gastroenterology*, 2021, 161 (4): 1325—1332. e7.

[4] Si YT, Xiong XS, Wang JT, *et al.* Identification of chronic non-atrophic gastritis and intestinal Metaplasia stages in the Correa's cascade through machine learning analyses of SERS spectral signature of non-invasively-collected human gastric fluid samples [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2024, 262: 116530.

[5] Chen X, Liu G, Yuan Y, *et al.* NEK7 interacts with NLRP3 to modulate the pyroptosis in inflammatory bowel disease via NF- κ B signaling[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(12): 906.

[6] Atabaki R, Khaleghzadeh-Ahangar H, Esmaili N, *et al.* Role of pyroptosis, a pro-inflammatory programmed cell death, in epilepsy[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2023, 43 (3): 1049—1059.

[7] 陈博, 孙夕童, 王伟, 等. 细胞焦亡在胃癌中的作用及中医药调控研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (15): 212—220.

[8] 彭果然, 程贝贝, 丁蓉珍, 等. 柴朴汤通过调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路改善哮喘大鼠细胞焦亡的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(22): 135—144.

[9] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, *et al.* The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (13): 3328.

[10] 林翔英, 王鑫, 钟国栋, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路探讨清化饮对慢性萎缩性胃炎大鼠胃上皮细胞焦亡的影响[J]. *实用中医内科杂志*, 2024, 38(11): 32—35.

[11] 周大光, 史蕾, 李晨. 荆花胃康胶囊治疗慢性萎缩性胃炎的疗效及对 NLRP3 通路介导炎症及焦亡的影响[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2024, 16(1): 132—135.

[12] 王秋月, 郑泽宇, 黄铭涵, 等. 基于细胞焦亡探讨慢性萎缩性胃炎脾胃湿热证的生物学机制[J]. *实用中医内科杂志*, 2025, 39 (4): 30—33.

[13] 沈家林, 易璐莹, 刘力, 等. 基于转录组测序技术分析三七、黄芪及其配伍对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜的作用机制[J]. *现代中西医结合杂志*, 2024, 33(23): 3219—3229, 3238.

[14] 张骏, 胡熙曦, 胡俊杰, 等. 基于网络药理学党参治疗胃溃疡的分子机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(8): 36—39, 259.

[15] 李萌, 田志华, 陈丁铭, 等. 基于数据挖掘和网络药理学探讨中药治疗慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生的用药规律及机制研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2024, 24(7): 783—788.

[16] 从禹. 基于 IL-11/JAK2 研究胃康宁干预慢性萎缩性胃炎模型大鼠疗效及效应机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.

[17] Huang M, Luo S, Yang J, *et al.* Optimized therapeutic potential of Sijunzi-similar formulae for chronic atrophic gastritis via Bayesian network meta-analysis[J]. *EXCLI Journal*, 2024, 23: 1185—1207.

[18] Wang L, Lian YJ, Dong JS, *et al.* Traditional Chinese medicine for chronic atrophic gastritis: Efficacy, mechanisms and targets [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2025, 31(9): 9—29.

[19] Oncel S, Basson MD. Gut homeostasis, injury, and healing: New therapeutic targets[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2022, 28(17): 1725—1750.

[20] Honing J, Keith TW, Dieninyte E, *et al.* Adequacy of endoscopic recognition and surveillance of gastric intestinal Metaplasia and atrophic gastritis: a multicentre retrospective study in low incidence countries[J]. *PLoS One*, 2023, 18(6): e0287587.

[21] Massironi S, Zilli A, Elvevi A, *et al.* The changing face of chronic autoimmune atrophic gastritis: an updated comprehensive perspective [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2019, 18 (3): 215—222.

(下转第 804 页)

overall survival in patients with lung cancer[J]. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2022, 13(5): 2504–2514.

- [32] Zhang M, Xie C, Liu S, *et al.* The prognostic value of the hemoglobin, albumin, lymphocyte, and platelet (HALP) score in lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2025, 14(16): 5701.

- [33] Yan M, Wang Z, Qiu Z, *et al.* Platelet signaling in immune

landscape: comprehensive mechanism and clinical therapy[J]. *Biomarker Research*, 2024, 12(1): 164.

- [34] Schmied L, Höglund P, Meinke S. Platelet-mediated protection of cancer cells from immune surveillance - possible implications for cancer immunotherapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 640578.

(收稿日期: 2026-02-25

修回日期: 2026-04-10)

(上接第 776 页)

- [22] 黎锦沅, 陈瑞年, 赵雯文, 等. 益气抗萎汤对慢性萎缩性胃炎患者相关生长因子及胃肠激素的影响[J]. *川北医学院学报*, 2024, 39(12): 1612–1615.

- [23] Jiang S, Zhang H, Li X, *et al.* Vitamin D/VDR attenuate cisplatin-induced AKI by down-regulating NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 206: 105789.

- [24] Cui Y, Cen Q, Feng J, *et al.* Sodium butyrate alleviates spinal cord injury via inhibition of NLRP3/Caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis[J]. *Metabolic Brain Disease*, 2025, 40(4): 157.

- [25] Zhou P, Zheng ZH, Wan T, *et al.* Yiqi Jiedu Huayu decoction inhibits precancerous lesions of chronic atrophic gastritis by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2024, 16(7): 3158–3168.

- [26] 廖桂彬, 唐舒婷, 廖晓意, 等. Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证的胃黏膜菌群特征及炎症水平分析[J]. *南京中医药大学学报*, 2022, 38(7): 576–583, 650.

- [27] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(4): 245–254.

- [28] Li N, Zhou H, Wu H, *et al.* STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3 [J]. *Redox Biology*, 2019, 24: 101215.

- [29] Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2019, 26(1): 99–114.

- [30] Wen J, Wu S, Ma X, *et al.* Zuojin Pill attenuates *Helicobacter pylori*-induced chronic atrophic gastritis in rats and improves gastric epithelial cells function in GES-1 cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 285: 114855.

- [31] Zhao Y, Zhao J, Ma H, *et al.* High hepcidin levels promote abnormal iron metabolism and ferroptosis in chronic atrophic gastritis [J]. *Biomedicine*, 2023, 11(9): 2338.

- [32] 智勇, 谢珊珊, 邵昌明, 等. 养阴活胃合剂通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路改善大鼠慢性萎缩性胃炎 [J]. *解剖科学进展*, 2024, 30(3): 271–274.

- [33] Li G, Zhu L, Cao Z, *et al.* A new participant in the pathogenesis of alcoholic gastritis: pyroptosis [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 49(1): 406–418.

(收稿日期: 2026-02-22

修回日期: 2026-04-10)